

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 990991 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **990991**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
G01N 33/573
G01N 33/68
G01N 33/57 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.04.1999**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.04.1999**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **31.10.2000**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Biohit Oyj, Laippatie 1, 00880 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Sipponen, Pentti, Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

2 • Härkönen, Matti, Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

3 • Suovaniemi, Osmo, Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

4 • Forsblom, Erik, Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä irreversiibleille neurovahingoille riskialttiin yksikön identifioimiseksi

Förfarande för att identifiera en individ med risk för irreversibla neurologiska skador

Menetelmä irreversiibleille neurovahingoille riskialttiin yksilön identifioimiseksi

Keksintö koskee diagnostista yhdistelmämenetelmää irreversiibleille neurologisille vahingoille, mukaan lukien dementialle, alttiiden yksilöiden identifioimiseksi.

5

Keksinnön mukainen menetelmä perustuu kahden testin yhdistelmään, jotka testit suoritetaan veri- tai seeruminäytteellä, erityisesti potilaiden identifioimiseksi, joilla on taipumus kehittää B12-puutos ja siten alttius kehittää sairauksia, jotka johtuvat tällaisesta puutoksesta, kuten irreversiibelit neurologiset vauriot, mukaan lukien dementia ja pernisiöosi anemia.

10

Monet erilaiset gastriset sairaudet tai tilat, kuten krooninen atrofisen gastriitti, pernisiöosi anemia, mahahaava, gastrinen polyypitauti ja Ménétrierin tauti (jättäläishypertrofinen gastriitti) edeltävät mahasyöpää. Limakalvon selvästi identifioitavia muutoksia ovat dysplasia ja adenooma. On arveltu, että melkein kaikissa sairauksissa alttius välittyy kroonisen atrofisen gastriitin kautta.

15

Krooninen gastriitti merkitsee mahan limakalvon pitkittyntä tulehdistilaa. Sairaus voidaan karkeasti jakaa superfisiaaliseen ja atrofiseen muotoon. Superfisiaalissa gastriitissa inflammatorinen soluinfiltrointi konsentroituu pintaepiteelin alle. Kun tulehdus etenee ja diffundoituu spesifisten gastristen eritysrauhasten väliin, on kyseessä krooninen atrofisen gastriitti. Tällöin metaplastiset muutokset korvaavat ainakin osittain mahan limakalvon normaalit rauhasrakenteet.

20

Potilailla, jotka kärsivät atrofisesta gastriitista mahan korpus-alueella, on mahasyövän suhteellisen riskin arvioitu, laskettuna suomalaisista syöpätilastoista, olevan 4- tai 5-kertainen verrattuna henkilöihin, joilla on terve limakalvo. Lisäksi on olemassa riski sairastua pernisiöosiin anemiaan, joka johtuu intrinsic-tekijän puutoksesta ja B12-vitamiinin imeytymishäiriöstä. Antrum-alueen vaikeassa atrofiassa riski on jopa 18-kertainen. Jos atrofisia muutoksia esiintyy sekä antrum- että korpus-alueella (pangastriitti), riski voi kasvaa jopa 90-kertaiseksi.

25

30

Julkaisussa WO 96/15456 esitetään menetelmä mahasyövän riskin seulomiseksi,

jonka menetelmän mukaan atrofia korpus- tai antrum-alueen tai molempien limakalvossa osoitetaan määrittämällä pepsinogeeni I:n (PGI) ja gastriini-17:n (G-17) analyyttipitoisuudet seruminäytteessä ja vertaamalla näin määritettyjä pitoisuuksia vastaavan analyytin menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon. Määritettyjä pitoisuuksia verrataan edullisesti myös vastaavan analyytin menetelmäspesifiseen viitearvoon.

Seerumin PGI-arvo, joka on alle PGI:n spesifisen cut-off-arvon, on osoitus atrofisesta gastriitista mahan korpus-alueella. Jos seerumin G-17-konsentraatio on alle sen cut-off-arvon, atrofia sijaitsee mahan antrum-alueella. Pangastriitissa seerumin PGI on alle cut-off-arvon ja seerumin G-17-arvo on sen viitearvon alemmalla rajalla.

Riittävä B12-vitamiinitarjonta on välttämätön folaattimetabolialle ja normaalille verituotannolle sekä hermosolujen toiminnalle. B12-vitamiini muodostaa kompleksin proteiinin, intrinsic-tekijän kanssa, jonka muodostaa mahan korpus-alueen limakalvo ja joka kompleksi resorboituu sykkyräsuolen alemmassa osassa. Tämä on B12-vitamiinin edullinen resorptiomuoto.

Intrinsic-tekijän puutos, joka johtuu atrofisesta gastriitista tai mahasyövästä, erityisesti mahan korpus-alueella, johtaa lopulta B12-vitamiinin puutokseen kehossa.

Pitkittynyt puutos voi johtaa pernisiösiin anemian kehittymiseen ja jo aikaisemmin, vuoden sisällä, irreversiibeliin neurologiseen vaurioon ja dementiaan. B12-vitamiinin puutos on täten tärkeä riskitekijä arvioitaessa neurologisten sairauksien, kuten dementian, kehittymistä erityisesti vanhemmalla väestöllä. On arvioitu, että B12-vitamiinin salakavala puutos vaivaa satojatuhansia ihmisiä. Näissä tapauksissa, jos puutos tiedetään, yksinkertainen ja tehokas hoito olisivat B12-vitamiiniriskeet. Olisi erityisen arvokasta kyetä identifioimaan ne yksilöt, joille ei vielä ole kehittynyt B12-vitamiinin puutosta mutta joilla tulevaisuudessa on olennainen riski saada se ellei ryhdytä toimenpiteisiin tällaisen puutoksen kehittymisen estämiseksi.

Keksinnön kohteena on menetelmä, jossa seeruminäytteestä tehtävä atrofisen

gastriitin markkerin määrittämiskoe yhdistetään B12-vitamiinikokeeseen, yksilön irreversiibelin neurologisen vaurion diagnoosin auttamiseksi tai riskin määrittämiseksi.

5 Keksinnön mukainen menetelmä on sellainen, jossa irreversiibelille neurologiselle vauriolle ja pernisiöösille anemialle riskialtis yksilö identifioidaan, menetelmän käsitteessä vaiheet, joissa

- määritetään kvantitatiivisesti pepsinogeeni I:n (PGI) analyyttikonsentraatiot mainitun yksilön seeruminäytteestä
- määritetään menetelmäspesifinen cut-off-arvo mainitulle analyytille,
- 10 - verrataan näin määritettyä analyyttikonsentraatiota analyytin menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon ja
- määritetään B12-vitamiinikonsentraatio tai mainittua B12-vitamiinikonsentraatiota korreloivan analyytin konsentraatio yksilön seeruminäytteesä, ja verrataan sitä näin määritetyn analyytin menetelmäspesifiseen viitearvoon.

15

Seerumin PGI- ja B12-vitamiinikonsentraatioiden, tai B12-konsentraatiota korreloivan aineen, määrittäminen voi tapahtua missä tahansa järjestyksessä, jotta saadaan samanaikaisesti tietoa sekä seerumin PGI- että B12-vitamiinipitoisuuksista, jonka tiedon tarkoituksena on olla avuksi neurologisen vaurion diagnostisoinnissa tai riskin arvioimisessa. Kuitenkin keksinnön suoritusmuodon mukaisesti seerumin PGI-konsentraatio määritetään ja sitä verrataan sen menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon ja jatkodiagnoosia varten valitaan yksilö, jonka seerumin PGI-konsentraatioarvo on alle sen menetelmäspesifisen cut-off-arvon. Tässä suoritusmuodossa B12-vitamiinitestiin seulotaan ainoastaan ne yksilöt, joilla on alhaiset seerumin PGI-arvot, osoituksena korpus-atrofiasta.

25

Näin ollen edullisen suoritusmuodon mukaan keksinnön tarkoituksena on erityisesti seuloa sellaiset yksilöt, joilla ei vielä ole B12-vitamiinin puutosta, toisin sanoen joilla on olennaisesti normaalit B12-vitamiinipitoisuudet mutta jotka, johtuen diagnostisoidusta mahan korpus-alueen atrofiasta, ovat alttiita tällaisen puutoksen kehittymiselle ajan mittaan. Tällainen identifiointi mahdollistaa jo aikaisessa vaiheessa turvautumisen ennalta ehkäiseviin toimenpiteisiin B12-vitamiinin puutok-

30

seen liittyvien sairauksien, erityisesti irreversiibelin neurologisen vaurion, joka kehittyy aikaisemmin kuin anemia, kehittymisen estämiseksi.

1. Pepsinogeeni I:n (PGI) määrittäminen

5

Menetelmä PGI:n määrittämiseksi seeruminäytteestä voidaan suorittaa julkaisussa WO 96/15456 esitetyllä tavalla, joka julkaisu liitetään tähän viitteenä.

10

Mainittu menetelmä sisältää edullisesti vaiheet, joissa käytetään pepsinogeeni I:n poly- tai monoklonaalisia vasta-aineita immunologisessa menetelmässä pepsinogeeni I:n määrittämiseksi. Reaktio suoritetaan edullisesti sopivalla kantajalla, kuten muovi-, lasi- tai selluloosakantajalla, esimerkiksi mikrolevyllä. Immunologiset menetelmät voidaan suorittaa tunnetulla tavalla käyttäen esim. absorbanssi-, luminesenssi- tai fluoresenssitekniikoita mainitun pepsinogeeni I-konsentraation mittaamiseksi näytteessä.

15

Jos seerumin pepsinogeeni I-konsentraatio on alle cut-off-arvon, joka, riippuen kyseessä olevan menetelmän spesifisyydestä ja sensitiivisyydestä, on 20-30 $\mu\text{g/l}$, joka vastaa noin 450-690 pmoolia/l, kyseessä on atrofia mahan korpus-alueella.

20

Normaali- tai viitearvo PGI:lle on alueella 25-120 $\mu\text{g/l}$.

2. B12-vitamiinin määrittäminen

25

B12-vitamiinin (kobalamiini) konsentraatio seeruminäytteessä voidaan määrittää minkä tahansa sinänsä tunnetun tähän tarkoitukseen käytetyn menetelmän mukaan.

30

Tällaisia tunnettuja menetelmiä ovat seerumin B12-mikrobiologinen koe, jossa käytetään organismeja, kuten *Euglena gracilista* tai *Lactobacillus leihmannia*, joka vaatii kobalamiinia kasvaakseen. Myös B12-vitamiinin radioisotooppisia laimennuskokeita on käytetty ja tällaiset koetekniikat on hyvin esitetty kirjallisuudessa, esim. Lau *et al.*, "Measurement of serum B12 levels using Radioisotope Dilution and Coated Charcoal", Blood, 26 (1965), 202. Radioisotooppilaimennusmenetelmät ovat nopeampia ja antavat tulokset, jotka ovat vertailukelpoisia esim. *Eugle-*

na-kokeella saatuihin tuloksiin, edellyttäen, että sidosproteiini on spesifinen biologisesti aktiiviselle kobalamiinille. Standardisoitu puhdas tai puhdistettu intrinsitekin valmistaja on kaikkein tyydyttävien sidosproteiinina, koska se sitoutuu spesifisesti todelliseen kobalamiiniin mieluummin kuin kobalamiinianalogeihin.

5

B12:n radioisotooppilaimennuskoe sisältää yleensä vaiheen, jossa endogeeninen B12 vapautetaan sen luonnollisesta sidosproteiinista, esim. keittämällä valitussa pH:ssa, jonka jälkeen lisätään mitattu määrä radioisotooppia ^{57}Co -B12 ja rajoitettu määrä sidosproteiinia. Kaikki sidosproteiini tulee sidottua jollain B12-muodolla, koska lisätyn radioisotoopin B12 määrä on riittävä sitomaan pienen määrän proteiinia. Koska sekä luonnollinen että radioaktiivinen B12 kilpailevat sitoutumisesta sidosproteiiniin, aste, johon B12:n sitoman proteiinin radioaktiivinen määrä inhiboituu, on osoitus B12:n määrästä näytteessä. Tätä menetelmää on muuntanut Lau, *supra*, erottamalla sitoutumattoman B12 proteiiniin sitoutuneesta B12:sta proteiinipäälystetyllä aktiivihiehellä ja supernatanttineen, joka sisältää sitoutuneen radioaktiivisen B12:n ja sitoutuneen ei-radioaktiivisen B12:n seoksen, radioaktiivisuus lasketaan. Seerumin B12-konsentraatio lasketaan sen jälkeen saadusta tuloksesta, usein vertaamalla standarditaulukkoon. Radiotestipakkauksia on kaupallisesti saatavissa menetelmän suorittamiseksi.

20

Saatavilla on myös muita menetelmiä B12-pitoisuuksien testaamiseksi seeruminäytteessä. Koska kobalamiinikoentsyymi on olennainen metyyylimalonaatin isomeroitua sukkinatiksi, B12-vitamiinipuutoksessa havaitaan metyyylimalonaatin kasvavien määrien erittyminen. Tässä tarjoutuu sensitiivinen testi B12-vitamiinipuutokselle. Lisäksi homokysteiinin plasmapitoisuudet myös kohoavat. US-patentti 4,940,658 kuvaa menetelmää homokysteiinin kohonneiden pitoisuuksien havaitsemiseksi, yhdistämällä näyte tunnetun määrän kanssa leimattua homokysteiiniä ja määrittämällä leimatun homokysteiinin suhde leimaamattomaan homokysteiiniin, esim. massaspektroskooppisilla menetelmillä, ja laskemalla sen jälkeen leimaamattoman homokysteiinin määrä näytteessä.

30

B12-vitamiinin puutos on määritetty myös esim. käyttäen kemiluminisenssi-resep-

torikokeita (Wentworth, S. *et al.*, Clin.Chem., Vol. 40, 537-540), radioimmunokokeita (Enders, D.B., *et al.*, Clin.Chem. Vol. 24, 460-465) sekä myös ei-isotooppisia sitoutumiskokeita, CEDIA, kloonatun entsyymidonorin immunokokeita (van der Weide, J., *et al.*, Clin.Chem., Vol. 38, 766-768).

5

Keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan käyttää mitä tahansa tunnettuja menetelmiä ja testipakkauksia B12-konsentraation tai aineen, kuten metyyylimalonaatin tai homokysteiinin, jonka konsentraation kohoamisen voidaan katsoa olevan osoitus B12-puutoksesta, määrittämiseksi.

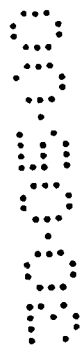
10

Viitearvo B12:lle on välillä 200-900 ng/l, vastaten noin 170-700 pmoolia/l.

Keksintö koskee myös testipakkausta käytettäväksi keksinnön mukaisessa menetelmässä, joka testipakkaus sisältää

15

- välineet PGI-konsentraation määrittämiseksi seeruminäytteessä,
- välineet B12-vitamiinikonsentraation tai mainittua B12-vitamiinia korreloivan analyytin konsentraation määrittämiseksi seeruminäytteessä.



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä irreversiibelille neurologiselle vahingolle ja pernisiöösille anemialle riskialttiin yksilön identifioimiseksi, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa

5

- määritetään kvantitatiivisesti pepsinogeeni I:n (PGI) analyyttikon-sentraatio mainitun yksilön seeruminäytteessä,
- määritetään menetelmäspesifinen cut-off-arvo mainitulle analyyttille,
- verrataan näin määritettyä analyyttikonsentraatiota analyytin mene-
telmäspesifiseen cut-off-arvoon ja

10

- määritetään B12-vitamiinikonsentraatio tai mainittua B12-vita-
miinikonsentraatiota korreloivan analyytin konsentraatio yksilön seeruminäytteessä ja verrataan sitä näin määritetyn analyytin menetelmäspesifiseen viitearvoon, jol-
loin PGI-konsentraatio, joka on alle cut-off-arvon, yhdessä normaalin B12- tai sitä
korreloivan analyytin konsentraation kanssa, osoittaa sanotun riskin olemassaolon.

15

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että määritetään see-
rumin PGI-konsentraatio ja valitaan B12-vitamiinin tai sitä korreloivan analyytin
jatkomääritykseen yksilö, jonka seerumin PGI-konsentraatio on alle sen cut-off-
arvon.

20

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että määritetään
B12-vitamiinikonsentraatio näytteessä.

25

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että määritetään me-
tyylimalonaatti- tai homokysteiinikonsentraatio näytteessä.

5. Testipakkaus patenttivaatimuksen 1 mukaisen menetelmän suorittamiseksi, joka
pakkaus sisältää

30

- välineet PGI-konsentraation määrittämiseksi seeruminäytteessä,
- välineet B12-vitamiinikonsentraation tai mainittua B12-vitamiinikon-

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
990991	G01N 33/573 33/68

TUTKITTU AINEISTO
Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US), tutkitut luokat
Tiedonhaut ja muu aineisto
Tiedonhakuja Euroopan Patenttinviraston tietokannasta EPODOC, tietokannoista WPI, CAPLUS ja MEDLINE

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
X	Laboratoriokäsikirja 98-99, Yhtyneet laboratoriot Oy, Otava 1997, s.312-313.	
X	MEDLINE AN 92329580, Regland et al. Aging, (1992) 4 (1) s.35-41.	
A	MEDLINE AN 1999019099, Lindgren et al. J. Intern. Med., (1998) 244 (4), s.341-349.	
<p>*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este</p>		
Päiväys	Tutkija	
30.11.1999	Ritva Karonen	